

· 论 著 ·

脐血来源未成熟树突状细胞低温冻存的实验研究

王逸涛 彭毅志 唐进 王强 王永权 游波



【摘要】 目的 观察脐血来源的未成熟树突状细胞(imDC)低温冻存前后的生物学特性,探讨 imDC 的保存方法。方法 取新鲜脐血分离单个核细胞(MNC),在体外经重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)和重组人白细胞介素(rhIL)4 诱导产生 imDC 后,加入二甲亚砜(DMSO)作为保护剂, -80 ℃ 降温, -196 ℃ 保存,40 ℃ 水浴复温,获得冻存 imDC。光学显微镜下观察冻存的 imDC 与新鲜 imDC 形态,计算其锥虫蓝拒染回收率(TBR);流式细胞仪检测细胞表面成熟标志;混合淋巴细胞反应(MLR)检测细胞刺激未致敏 T 淋巴细胞的增殖能力。结果 脐血 MNC 在 rhGM-CSF 和 rhIL-4 诱导下可向树突状细胞(DC)分化,相差显微镜显示细胞形态不规则,细胞表面呈树枝样突起;扫描电镜显示,细胞表面不规则,有树枝样突起和不规则皱褶。冻存 imDC 复苏后 TBR 为(86.8 ± 1.3)%,冻存 imDC 在形态上与新鲜 imDC 无明显差异。MNC 体外经 rhGM-CSF 和 rhIL-4 诱导生成的 imDC 表面 CD1a 阳性率为(62 ± 8)%、CD14 为(18 ± 7)%、人类白细胞 DR 抗原(HLA-DR)为(67 ± 5)%、CD80 为(13 ± 7)%、CD86 为(12 ± 5)%;反映 DC 成熟的表面标志物 CD83 为(4.6 ± 2.0)%,符合 imDC 的表型特征。冻存 imDC 的 CD80、CD86、CD83 分别为(15 ± 5)%、(17 ± 5)%、(7.4 ± 3.3)%,较新鲜 imDC 有所增高($P < 0.05$),但仍符合 imDC 的表型特征。对照组 MLR 的每分钟放射性荧光闪烁计数(cpm)值为(488 ± 197) min⁻¹;新鲜 imDC 组为(463 ± 104) min⁻¹,与冻存 imDC 组的 cpm 值(512 ± 78) min⁻¹比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组细胞刺激指数(SI)均 < 2。新鲜 imDC 和冻存 imDC 均不能有效刺激同种未致敏 T 淋巴细胞增殖。结论 本实验中获得的冻存 imDC 具有足够的细胞活力,其细胞免疫表型和细胞功能具有不成熟特征,说明利用 DMSO 低温保存 imDC 的方法可行。

【关键词】 树突细胞; 低温保存; 脐血

Experimental study on cryopreservation of immature dendritic cells derived from cord blood WANG Yi-tao, PENG Yi-zhi, TANG Jin, WANG Qiang, WANG Yong-quan, YOU Bo. Institute of Burn Research, Southwest Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China

Corresponding author: PENG Yi-zhi, Email: yizhipen@mail.tmmu.com.cn, Tel: 023-68754175

【Abstract】 Objective To investigate the biological properties of immature dendritic cells(imDC) derived from cord blood before and after cryopreservation, so as to provide a method for preservation of imDC. **Methods** Immature dendritic cells were generated from human cord blood (CB) monocytes and cultured with rhGM-CSF and rhIL-4, and 10% DMSO was added into culture medium as cryopreservation reagent. After freezing in -80 ℃ refrigerator, the cells were finally cryopreserved in -196 ℃ liquid nitrogen, and then thawed with 40 ℃ water, and they were finally named frozen-thawed imDC. The morphology of imDC were observed with light microscope, and TBR were calculated. Cellular surface markers for DC maturation were determined with flow cytometry, and the ability of the cells to stimulate proliferation of non-sensitized T lymphocyte was determined with allogeneic mixed lymphocyte reaction. **Results** Monocyte (MNC) from cord blood could differentiate into DC after GM-CSF and rhIL-4 induction. Under light microscope, the cells showed irregular morphology, with branch-like prominence on the cell surface. Similar changes were also observed with scan electron microscope. The cryopreserved imDC were resistant to trypan blue staining, and TBR was (86.8 ± 1.3)%. There was no obvious difference in the cell morphology between cryopreserved and fresh imDCs. The expression of cell surface markers and maturation markers in imDCs before cryopreservation were as follows: CD1a(62 ± 8)%, CD14 (18 ± 7)%, HLA-DR (67 ± 5)%, CD80 (13 ± 7)%, CD 86 (12 ± 5)%. Though the expression of CD80, CD86 and CD83 of cryopreserved imDC increased to

基金项目:国家自然科学基金资助项目(3027134)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通信(讯)作者:彭毅志, Email: yizhipen@mail.tmmu.com.cn, 电话:023-68754175

(15 ± 5)%, (17 ± 5)% and (7.4 ± 3.3)%, respectively ($P < 0.05$), they still possessed the phenotype of imDC. There exhibited no obvious difference in cpm value between fresh imDC [$(463 \pm 104) \text{ min}^{-1}$] and cryopreserved imDC [$(512 \pm 78) \text{ min}^{-1}$], ($P > 0.05$). The cpm in control group was (488 ± 197) min^{-1} . The stimulation index in all groups was lower than 2, and both fresh imDC and cryopreserved imDC could not stimulate the proliferation of non-sensitized T lymphocyte. **Conclusion** The cryopreserved imDC exhibits immature characteristic in cell phenotypes, function and good cell activity, indicating that the method of cryopreservation of imDC is feasible.

【Key words】 Dendritic cells; Cryopreservation; Fetal blood

利用未成熟树突状细胞 (immature dendritic cell, imDC) 在同种器官移植中诱导抗原特异性免疫耐受, 并维持其耐受状态已成为研究热点。树突状细胞 (DC) 在体内含量低, 在促成熟物质的作用下 imDC 容易受其刺激而发育成熟, 不能很好地保持其不成熟特性来诱导免疫耐受, 反而引起免疫排斥。对 imDC 进行低温冻存是解决这些问题的较好选择。为此笔者观察了低温冻存前后 imDC 的生物学特性, 以期作为 imDC 的临床应用提供可靠的保存方法。

材料与方法

一、主要试剂及标本来源

RPMI 1640 细胞培养液 (美国 Sigma 公司), 标准胎牛血清 (FCS)、人淋巴细胞分离液 (天津 TBD 公司), 重组人白细胞介素 (rhIL)4、重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (rhGM-SCF, 美国 Santa Cruz 公司), 二甲亚砜 (DMSO, 美国 Sigma 公司), 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的鼠抗人 CD1a (美国 Biolegend 公司), CD14、CD80、CD83、CD86 和人类白细胞 DR 抗原 (HLA-DR, 法国 Diaclone 公司), 小鼠 IgG1、IgG2b (美国 Caltag 公司), 氚标记胸腺嘧啶脱氧核苷 ($^3\text{H-TdR}$) 购自北京中国原子能研究所。脐血标本来源于本院妇产科健康足月剖宫产新生儿 (产妇均知情同意)。外周血标本来自健康志愿献血者, 肝素抗凝浓度为 20 ~ 25 U/ml。

二、单个核细胞 (MNC) 的增殖培养

取脐血 40 ~ 50 ml, 用淋巴细胞分离液梯度离心 ($500 \times g$ 离心 20 min) 分离 MNC, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 离心洗涤 4 次后, 用含体积分数 10% FCS 的 RPMI 1640 培养液制备 MNC 悬液, 放入培养瓶, 37 °C、体积分数 5% CO_2 培养箱培养 2 h, 吸去非贴壁细胞, 重新加入 5 ml 含体积分数 10% FCS 的 RPMI 1640, 添加 rhGM-CSF 和 rhIL-4 各 100 $\mu\text{g/L}$ 后继续培养。半量换液, 1 次/2 d, 并补充培养液及各种细胞因子至全量。

三、imDC 的冻存和复苏

取 DMSO 150 μl , 加入 4 °C 预冷的 RPMI 1640 至 750 μl 作为保护剂。imDC 重悬于 750 μl 含体

积分数 10% FCS 的 RPMI 1640, 置于 4 °C 冰箱 1 h, 缓慢加入保护剂, 使 DMSO 体积分数为 10%, 转入冻存管, 放入 -80 °C 冰箱, 12 h 后置于 -196 °C 液氮装置中保存。30 ~ 35 d 后取出冻存管, 迅速放入 40 °C 水浴复温, 细胞悬液融化后立即吸出, 加入 10 ml 含体积分数 10% FCS 的 RPMI 1640 稀释, $200 \times g$ 离心 5 min, 重复洗涤 3 次, 细胞重新悬浮于 RPMI 1640 培养液中待检。

四、检测指标

1. 新鲜 imDC 与冻存 imDC 的形态学观察和锥虫蓝拒染回收率 (TBR) 检测: 在光学相差显微镜下观察 imDC 的形态。培养第 7 天收获 imDC, 调整细胞含量为 $5 \times 10^5/\text{ml}$, 吸取 0.5 ml 置于清洁盖玻片上, 自然干燥后, 加入体积分数 2.5% 戊二醛固定。常规制片, 在扫描电镜下观察、照相。计算 TBR (%) = 冻存后细胞数 ÷ 冻存前细胞数 × 锥虫蓝拒染率。

2. 新鲜 imDC 与冻存 imDC 表型的检测: 将培养的 imDC 以 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 悬浮于 1 ml PBS, 离心 ($400 \times g$ 离心 5 min) 洗涤 2 次后, 重新悬浮于 0.2 ml PBS 中, 再分别加入 FITC 标记的鼠抗人 CD1a 20 μl 、CD80 10 μl 、CD83 10 μl 、CD86 10 μl 、CD14 20 μl 、HLA-DR 10 μl 及相应同型对照, 4 °C 孵育 30 min 后, PBS 离心 ($400 \times g$ 离心 5 min) 洗涤 2 次, 细胞重新悬浮于 0.5 ml PBS, 流式细胞仪 (FACS Caliber 型, 美国 BD 公司) 检测。

3. 混合淋巴细胞反应 (MLR) 检测未致敏 T 淋巴细胞增殖情况: DC 重新悬浮于 1 ml RPMI 1640 培养液中, 洗涤 3 次后调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。尼龙毛法^[1]收集外周血 MNC 中的 T 淋巴细胞, 调整其浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。在 96 孔培养板上, 分为对照组: 每孔加入 T 淋巴细胞 2×10^5 个; 新鲜 imDC 组: 每孔加入新鲜 DC 和 T 淋巴细胞各 1×10^5 个; 冻存 imDC 组: 每孔加入冻存 DC 和 T 淋巴细胞各 1×10^5 个。每组 5 个复孔, 终体积均为 200 μl 。将培养板置于 37 °C、体积分数 5% CO_2 培养箱内孵育 72 h, 培养结束前 18 h, 每孔加入 1.85×10^{10} Bq $^3\text{H-TdR}$ 。在

液体闪烁计数仪上检测每分钟放射性荧光闪烁计数 (cpm) 值。本实验重复 3 次。计算刺激指数 (SI) = 实验组 cpm 值 ÷ 对照组 cpm 值。SI 的标准值为 2, SI < 2 表示淋巴细胞无明显增殖, SI ≥ 2 表示淋巴细胞增殖明显。

五、统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 12.0 统计软件分析, 行 *t* 检验。

结 果

1. imDC 的形态学观察以及 TBR: 脐血 MNC 在 rhGM-CSF 和 rhIL-4 诱导下可向 DC 分化, 相差显微镜显示细胞形态不规则, 细胞表面呈树枝样突起 (图 1); 扫描电镜显示细胞表面不规则, 有树枝样突起和不规则皱褶 (图 2)。冻存 imDC 复苏后锥虫蓝拒染, TBR 为 (86.8 ± 1.3)%, 冻存 imDC 在形态上与新鲜 imDC 无明显差异。



图 1 imDC 的形态不规则, 表面呈树枝样突起 相差显微镜 ×400。a. 新鲜 imDC; b. 冻存 imDC



图 2 imDC 的表面不规则, 有树枝样突起和不规则皱褶 扫描电镜 ×4 000。a. 新鲜 imDC; b. 冻存 imDC

中华烧伤杂志 2006年12月第22卷第6期

2. imDC 表型的检测: MNC 体外经 rhGM-CSF 和

rhIL-4 诱导生成的新鲜 imDC 表面 CD14 阳性率为 (62 ± 8)%, CD14 为 (18 ± 7)%, HLA-DR 为 (67 ± 5)%; 细胞表面共刺激分子 CD80 和 CD86 分别为 (13 ± 7)%, (12 ± 5)%; 反映 DC 成熟的表面标志物 CD83 为 (4.6 ± 2.0)%, 符合 imDC 的表型特征。冻存 imDC 的 CD80、CD86、CD83 分别为 (15 ± 5)%, (17 ± 5)%, (7.4 ± 3.3)%, 较新鲜 imDC 有所增高 ($P < 0.05$), 但仍符合 imDC 的表型特征。冻存前后 imDC 的免疫表型未发生显著改变, 冻存后 imDC 仍保持其未成熟状态。

3. MLR 检测结果: 对照组 cpm 值为 (488 ± 197) min⁻¹; 新鲜 imDC 组为 (463 ± 104) min⁻¹, 与冻存 imDC 组的 cpm 值 (512 ± 78) min⁻¹ 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 各组 SI 均 < 2。新鲜 imDC 和冻存 imDC 均不能有效刺激同种未致敏 T 淋巴细胞增殖。

讨 论

DC 是人体内最重要的抗原呈递细胞 (APC)。而 imDC 由于其细胞表面低表达主要组织相容性复合物 II 类分子 (MHC-II) 和共刺激分子 (CD80、CD86), 非但不能激活 T 淋巴细胞, 反而能诱导抗原特异性 T 淋巴细胞无能或凋亡, 从而诱导了对该抗原的耐受^[2]。在大面积深度烧伤患者的救治工作中, 由于自体皮源不足, 异体皮移植成为一种有效的治疗手段。国内学者利用 imDC 术前预处理受体, 成功延长了大鼠异体皮成活时间^[3]。至今临床上使用的异体皮均来自于死者捐赠, 如何在术前提供有效的供者 imDC 成为烧伤治疗的关键。目前通过 CD34 + MNC 体外诱导扩增可获得足够的 imDC^[4,5]。但 DC 最长寿命为 3 个月, 而且在促成熟物质的作用下, imDC 容易受其刺激而发育成熟, 不但不能诱导免疫耐受, 反而引起免疫排斥。低温冻存是公认的细胞最佳保存方法。将细胞储存在液氮中, 温度达到 -196 °C, 理论上储存时间是无限的^[6]。保存 imDC 技术的关键在于获得满意的细胞回收率, 同时回收的 imDC 仍能够保持其不成熟特性, 即不能刺激同种未致敏 T 淋巴细胞增殖, 从而诱导抗原特异性免疫耐受。有学者观察到 imDC 经过低温冻存后 CD86 和 CD83 表达上调, 认为细胞发生了其向成熟 DC 的转化^[7,8]。笔者在本实验中也可观察到类似现象, 但对细胞的免疫学特性并未构成威胁。低温冻存后 CD86 和 CD83 表达上调的原因还有待于进一步研究。

综上所述,本研究利用脐血来源的MNC培养imDC,经过低温冻存后能够获得满意的回收率,同时该细胞具有imDC的典型形态,低水平表达共刺激分子CD80和CD86,体外激发未致敏T淋巴细胞增殖的能力较弱。结果表明这种方法能够长期有效保存imDC。

参考文献

- Gunzer M, Weishaupt C, Planelles L, et al. Two-step negative enrichment of CD4⁺ and CD8⁺ T cells from murine spleen via nylon wool adherence and an optimized antibody cocktail. *J Immunol Methods*, 2001, 258:55-63.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21:685-711.
- 刘芳,魏力.供者未成熟树突状细胞对大鼠皮肤移植免疫耐受的诱导. *咸宁医学院学报*, 2002, 16:110-112.

- 王强,彭毅志.小鼠骨髓未成熟树突状细胞体外扩增及鉴定. *中华烧伤杂志*, 2003, 19:332-335.
- Seager DJ, Lutz M, Hama S, et al. Method for large scale isolation, culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation. *J Immunol Methods*, 2004, 288: 123-134.
- 黄友章,杨平地,沈建良,等.低温冻存脐血树突状细胞的生物特性研究. *海军总医院学报*, 2002, 15:202-206.
- Jorg W, Ida J, Koerner JK. Cryopreservation of mature monocyte-derived human dendritic cells for vaccination; influence on phenotype and functional properties. *Cancer Immunol Immunother*, 2003, 52: 194-198.
- Justin J, James H, Angus D. Cryopreservation of immature monocyte-derived dendritic cells results in enhanced cell maturation but reduced endotoxic activity and efficiency of adenoviral transduction. *J Immunol Methods*, 2000, 272:35-48.

(收稿日期:2005-12-27)

(本文编辑:张红)

救治百岁老人烧伤一例

沈小鹏 贾赤宇 梁家科

患者女,103岁,因在床上玩火柴不慎点燃衣被致全身多处烧伤。先后用美宝湿润烧伤膏(汕头美宝制药有限公司,批号:国药准字Z20000004)、京万红软膏(天津达仁堂制药二厂,批号:041002)及磺胺嘧啶银霜涂抹创面,无好转,伤后17d入院。患者意识清楚,听力,语言功能基本丧失。面颈部、躯干、左上肢有4%TBSAⅢ度创面;左耳有1%TBSAⅣ度创面。焦痂已开始液化,分泌物多,恶臭,肉芽组织色泽晦暗、水肿,左耳上、外1/4缺损且有干痂覆盖。见图1,2。实验室检查:血清白蛋白26.0g/L,血红蛋白105g/L,肝、肾功能无异常,胸部X线片、心电图无异常,创面细菌培养检出缓慢葡萄球菌,对庆大霉素、利福平、磺胺类、万古霉素敏感,对其余抗生素均耐药。患者入院后立即静脉输注人血白蛋白10g纠正低蛋白血症;全身浸浴,隔日1次;创面用磺胺嘧啶银霜包扎换药。入院后第5天改用等渗盐水纱布湿敷换药,入院后第6天,创面完全溶痂,分泌物明显减少,异味消失,肉芽组织新鲜,色泽转红润。入院后第7天,在全身麻醉下彻底清除左耳坏死的部分软骨后,创面予以厚皮片覆盖(头

部供皮),其余创面彻底清除肉芽组织后,予以全厚皮覆盖(腹部供皮,16cm×13cm);术后间断、少量、多次输血纠正低白蛋白血症。实验室检查:血清白蛋白35.2g/L,血红蛋白128g/L。同时应用敏感抗生素预防感染以及对症治疗。术后10d自体皮完全成活(图3,4),术后15d患者痊愈出院。

讨论 一百岁以上的高龄老人烧伤后行植皮术的病例较为少见。老年人皮肤随年龄增长而变薄,皮肤附属器如毛囊、汗腺、皮脂腺均衰退,同时全身免疫功能低下,因而伤后创面不易愈合。该患者烧伤创面深达Ⅲ-Ⅳ度,总面积为5%TBSA,入院时创面污染重,精神萎靡。经过积极的创面浸浴、换药、全身营养支持、术中认真处理创面,皮片100%成活。由此表明,高龄不是手术的绝对禁忌,术前、术中、术后的处理对于植皮成活率至关重要,特别是术前积极的创面处理,改善全身一般情况,选择合适的手术方法和术后加强综合治疗等等,均为救治成功的重要因素。由于老年人皮肤松弛,腹部可提供较大面积的全厚皮,不仅使创面愈合后外形和功能满意,而且供区可直接缝合。

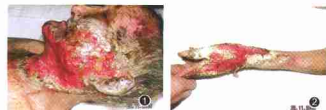


图1 术前面颈部创面形态不规则,坏死组织未脱尽,部分耳软骨坏死术后面颈部植皮100%成活



图4 术后左手腕部植皮100%成活



图2 术前左手腕部肉芽组织晦暗,部分老化、水肿



图3

作者单位:100037 北京,解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所

通信(讯)作者:贾赤宇,Email:cyburns@yahoo.com.cn,电话:13940422271

(收稿日期:2006-04-12)

(本文编辑:莫恩)